



417377

F.C-26-6-75

Int. Cl.<sup>2</sup>: C07D // A61K

P A T E N T E  
D E  
I N V E N C I O N

por "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR TRI-P-TOLUENSULFONATO DE S-ADENOSIL-L-METIONINA", a favor de la firma italiana ERREKAPPA BIOTERAPICI S.A.S., residente en Via Marcona 37, MILANO (Italia).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

- Este invento se refiere a una nueva sal enzimática, al procedimiento para su preparación y a las composiciones terapéuticas que la contienen. Las concretamente, este invento se refiere a una nueva sal extremadamente estable de
5. S-Adenosil-L-Metionina (SAM), a un procedimiento que hace posible su preparación de forma sencilla y económica a escala industrial y a las composiciones farmacéuticas que la contienen como el principio activo, para utilizarse en numerosos campos de la terapéutica humana.
  10. El SAM es un producto notablemente de origen natural, que se encuentra en todos los organismos vivientes des-

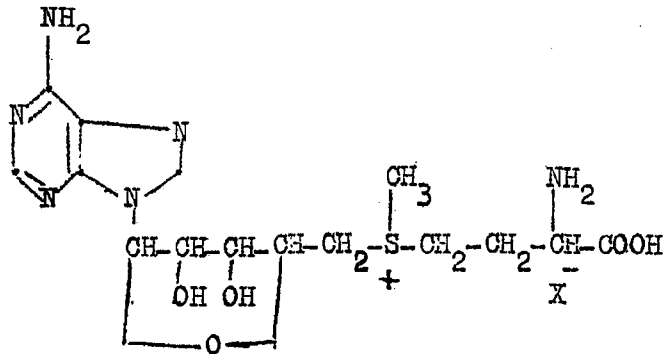
417377

= 2 =



de las bacterias a las plantas y desde los organismos monoce-  
lulares a los mamíferos superiores incluyendo el hombre, cu-  
ya estructura se conoce desde hace algún tiempo y viene iden-  
tificada por la fórmula siguiente:

5.



10.

en la que

X es un anión genérico.

En los organismos vivos el SAM se forma por la in-  
tervención de enzimas (S-adenosilmetioninsintetasis o S-ade-  
nosiltransferasis) en el ámbito citoplasmático a partir de me-  
tionina asociada con los nutrimentos o a partir del ATP pre-  
sente como reserva de energía en cada célula viviente.

15.

Se sabe también, desde hace cierto tiempo que el  
SAM es un producto de importancia fundamental en un gran nú-  
mero de reacciones biológicas de transmetilación enzimática,  
por cuyo motivo siempre se ha considerado un reactivo muy im-  
portante en bioquímica.

20.

Sin embargo, el mayor problema con esta sustancia  
ha surgido siempre debido a su extrema inestabilidad a la tem-  
peratura ambiente o a temperaturas superiores a ésta.

25.

En los últimos años la investigación dirigida hacia  
la estabilización del SAM con el fin de hacer posible su uti-  
lización en el campo de la investigación biológica se ha pro-  
yectado hacia la preparación de sales que resulten estables  
en condiciones de temperatura y humedad normales.

30.

417377

= 3 =



5. En este sentido se obtuvo el cloruro y el sulfato de SAM que se utilizan únicamente como reactivos en bioquímica durante cortos períodos de tiempo debido a que, aún en estado seco, es limitada su estabilidad y sus procedimientos de preparación tan solo pueden utilizarse para la producción en pequeña cantidad y, ciertamente, no pueden utilizarse para la producción a escala industrial.

10. Ahora se ha descubierto, de forma totalmente inesperada, una nueva sal de SAM que tiene estabilidad indefinida con el transcurso de tiempo y a la temperatura ambiente, que puede prepararse de forma industrial con rendimientos elevados y de forma económica y que, sorprendentemente ha demostrado poseer gran poder curativo en muchos campos de la terapéutica humana, frecuentemente sin relación entre sí.

15. La nueva sal, según el presente invento, es una sal de SAM con ácido p-toluensulfónico, que tiene la fórmula  $\text{SAM}^+ \text{CH}_3 \text{C}_6\text{H}_4 \text{SO}_3^- \cdot 2\text{CH}_3 \text{C}_6\text{H}_4 \text{SO}_3\text{H}$  y que en lo sucesivo, con el fin de abreviar, se le denominará  $\text{SAM} \cdot \text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{S}_3\text{O}_9$ .

20. El elevado grado de progreso técnico puede apreciarse en la tabla que sigue, la cual compara la estabilidad con el tiempo, a 25°C, en estado seco, de dos de las sales más estables de SAM hasta ahora conocidas, o sea el cloruro y el sulfato, y el nuevo triparatoluensulfonato. Las cifras hacen referencia al porcentaje de residuo de SAM después del tiempo indicado:

25.

TABLA 1

Anión	30 d	180 d	360 d	540 d
Cloruro	65	-	-	-
Sulfato	91.7	61.0	-	-
30. Tri-p-toluensulfonato	98.5	92.2	84.2	80.1



El procedimiento para la preparación de la nueva sal, según el invento, comprende esencialmente las etapas siguientes:

5. a) el tratamiento de levadura (*Saccharomyces Cerevisiae*, *Torulopsis utilis*, *Candida utilis*, etc.) enriquecida con SAM por la adición de metionina, bajo condiciones apropiadas (Schlenk, *Enzymologia* 29, 283 (1965)), con acetato etílico o metílico a la temperatura del ambiente, con el fin de producir la lisis de las
10. células y producir la disolución al 100% del SAM presente.
- b) la absorción de la solución acuosa filtrada en una columna de resina catiónica débil en forma ácida.
- c) la eliminación de las impurezas por lavado con agua y luego con 25 milimoles de ácido acético.
15. d) la elución selectiva del SAM con una solución acuosa de ácido p-toluensulfónico.
- e) la neutralización del ácido p-toluensulfónico en exceso por tratamiento con una resina aniónica débil o fuerte (forma  $\text{OH}^-$ ) hasta que se obtiene una relación molar de ácido p-toluensulfónico: SAM comprendida entre 3 y 10, de preferencia 6, aproximadamente.
20. f) la concentración, bajo vacío y a la temperatura ambiente, o la liofilización de la solución hasta que se obtiene un volumen final comprendido entre 2 y 4 veinteaños del volumen inicial, de preferencia de 3/20, aproximadamente.
25. g) la adición al concentrado de un disolvente orgánico miscible en agua (por ejemplo, etilo, propilo, isopropilo, alcohol, acetona, metiletilcetona, etc.) lo que produce la precipitación de la sal SAM.  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{S}_3\text{O}_9$ ,
- 30.

417377

= 5 =



en estado prácticamente puro.

5. - La etapa (a) del procedimiento según el invento se efectúa utilizando una cantidad de acetona comprendida entre 1/20 y 1/5, de preferencia 1/10, del peso de las células húmedas, y se prolonga durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y 2 horas, de preferencia 1 hora.

10. Debe hacerse constar que la lisis de las células de levadura efectuada con disolventes orgánicos es mucho mas apropiada en el procedimiento del presente invento que la que se lleva a cabo normalmente con ácido perclórico, ácido fórmico o ácido acético y similares a 60°C, debido a que no precisa elevadas temperaturas, las cuales tienen un efecto negativo sobre la estabilidad del SAM, especialmente bajo las condiciones del pH originadas por la presencia de los ácidos de lisis. Además, la ausencia de ácidos fuertes en la solución posibilita el empleo, en la etapa siguiente, de una resina catiónica débil con volumen reducido y hace posible el empleo de equipo normal sin que exista peligro de corrosión.

15. Por último, la desnaturalización de las proteínas efectuada con el disolvente orgánico hace que sean mas fácilmente filtrables los residuos celulares.

20. - La etapa (b) del procedimiento se lleva a cabo, de preferencia, utilizando una columna de resina catiónica débil, tal como IRC-50, forma H<sup>+</sup>.

25. - La etapa (d) puede llevarse a cabo utilizando soluciones de concentraciones hasta 1 molar de ácido p-toluen-sulfónico en agua.

30. Esto ofrece una gran ventaja en la etapa subsiguiente de concentración de la solución.

- Para neutralizar el exceso de ácido p-toluen-sulfónico en la etapa (b), han probado ser particularmente efica-

417377

= 6 =

30



ces las resinas Amberlite IRA 900 o Amberlite IR 45.

La relación final de ácido p-toluensulfónico: SAM se ha encontrado que resulta crítica con respecto a la formación de las mejores condiciones puesto que en la etapa subsiguiente de precipitación del p-toluensulfonato de SAM todas las sales catiónicas inorgánicas permanecen en solución junto con las pequeñas cantidades de impurezas que pueden estar presentes, mientras que existe una precipitación cuantitativa de la sal. El procedimiento para preparar SAM.  $C_{21}H_{23}S_3O_9$ , según el presente invento, se ha descrito hasta ahora en su realización preferida, la cual ha dado los mejores resultados industriales.

A continuación se citan algunas modificaciones que se han experimentado con buenos resultados, mientras que otras resultarán evidentes para los expertos en el arte.

En principio resulta obvio que el tri-p-toluensulfonato de SAM puede ser precipitado por cualquier solución acuosa que contenga SAM. Esta puede ser, por ejemplo, una solución que se origine a partir de las síntesis enzimática o de la síntesis química de SAM, o una solución acuosa de una de sus sales solubles. Sin embargo en cada caso se obtiene un producto menos puro con un rendimiento inferior.

Una modificación ulterior del procedimiento consiste en eluir el SAM adsorbido en la resina catiónica débil con una solución acuosa de ácido clorhídrico o de ácido sulfúrico en lugar de utilizar directamente el ácido p-toluensulfónico.

Los aniones del cloruro y del sulfato pueden eliminarse del eluato, en forma apropiada, por ejemplo con una resina aniónica, adicionándose una cantidad calculada de ácido p-toluensulfónico en idéntica proporción a la descrita para la precipitación directa y luego precipitando el tri-p-toluensulfonato.

417377

= 7 =

30



De forma alternativa, puede precipitarse un cloruro o sulfato de SAM a partir de eluatos después de eliminar parcialmente el exceso de ácido, ya sea por evaporación o por tratamiento con una base apropiada. El sulfato o cloruro así precipitado se redisuelve en agua, y después de la eliminación del anión y de la adición de ácido p-toluensulfónico en la proporción antes indicada, se precipita el tri-p-toluensulfonato.

Para la eluación de SAM pueden utilizarse de modo análogo, otros ácidos fuertes, sin que ello aporte no obstante, ventaja alguna particular.

En los ejemplos que siguen se ilustra el método para preparar la nueva sal según el invento, utilizando el método preferido y ciertas modificaciones, entendiéndose que estos ejemplos son únicamente ilustrativos y no implican limitación del invento.

EJEMPLO 1.

Se adicionan, a la temperatura ambiente, 9 litros de acetato de etilo a 90 kg de levadura enriquecida con SAM (5,5 g/kg) según Schlenk (Enzymologia 29, 283 (1965)).

Después de agitación enérgica durante 1 hora se diluye la masa con 40 kg de agua; ésta se filtra y se lava obteniéndose 140 litros de solución que contiene 3,55 g/l de SAM, igual al 99,5% del presente en el material de partida. Se absorben 14 litros de esta solución en 1 litro de resina Amberlite IRC 50, forma H<sup>+</sup>, y luego se eluyen de forma sucesiva con: a) agua; b) ácido acético 0,025N; c) con una solución 1 molar de ácido p-toluensulfónico. Las fracciones ricas en SAM prácticamente puro (determinado por cromatografía de capa delgada según Anal. Biochim. 4, 16-28 (1971)) son iguales, en general, a 1,8 litros y contienen 85% del producto alimentado en la columna. Se trata esta solución con 1,7 li-

5. tros de resina Amberlite IRA 900, forma OH<sup>-</sup>. Después de filtrar y lavar la resina con agua, se obtiene una solución que contiene 2,2% de ácido p-toluensulfónico y 0,85% de SAM. Se concentra la solución a la temperatura ambiente y bajo vacío, hasta 600 cc, y luego se le adiciona acetona. Se precipita una sal microcristalina, pulverulenta y blanca, que es inodora, higroscópica y muy soluble en agua (mas del 25%) con la formación de una solución incolora. La sal no es muy soluble en metanol o etanol y es insoluble en acetona, metilacetona, cloroformo, alcoholes superiores y benceno.

10.

El análisis de la sal ofrece los resultados siguientes:

C = 46,9%; N = 5,3%; N = 9,2%, S = 13,8%

15. Para C<sub>36</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>S (peso molecular = 915,1) los resultados calculados son:

C = 47,20%; H = 5,15%; N = 9,18%; S = 14,00%

Además: ácido p-toluensulfónico= 55,8%

SAM = 42,5%

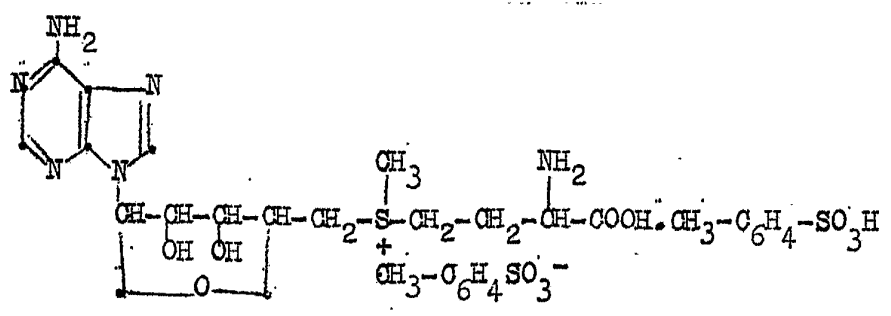
Calculado: ácido p-toluensulfónico= 56,4%

20. SAM = 43,6%

Pérdida de peso por secado durante 12 horas a la temperatura ambiente bajo vacío en P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : 1,5-2% Humedad determinada según K. Fischer: 1,5-2% El espectro por rayos ultravioleta de los nuevos compuestos muestra una absorción máxima a 256 mm. E 15.600 (en ácido sulfúrico 6N); a 260 milimicras, E = 16.300 (a pH 7).

25.

Todos estos datos se ajustan a un compuesto de la fórmula



417377



- El nuevo compuesto se ha identificado además con el método enzimático basado en la metilación enzimática de la nicotinamida o el ácido acético de guanidina con SAM (G.L. Cantoni, J. Biol. Chem. 189, 745 (1951); ibid. 204, 403 (1953);
5. G. De La Hoba, G.A. Jamieson, S.H. Mudd, H.H. Richards, J.A. C.S. 81, 3975 (1959) ).

EJEMPLO 2.

- Se tratan como en el ejemplo 1, 9 kg de levadura y, después de la lisis de las células se obtienen 13,8 litros de solución conteniendo 3,60 g/l de SAM, igual al 99% del presente en el material tratado. Esta solución se absorbe en 1 litro de resina IRC 50, forma  $H^+$ , y se eluye con agua, ácido acético 0,025N y una solución de HCl 4N. Las fracciones ricas en SAM puro, examinadas como en el ejemplo 1, corresponden a 0,8 l. y contienen 87% del producto alimentado en la columna. Este se evapora hasta sequedad a 40° bajo vacío.
- 10.
- 15.

- Se adiciona agua hasta que se obtiene una solución de SAM al 5%, manteniendo la solución a 0°C, y se adiciona resina Dowex 50, forma  $OH^-$ , hasta que una muestra de la solución indica la ausencia de cloruros.
- 20.

- Se separa la resina por filtración, se adicionan 110 g de ácido p-toluensulfónico y se concentra hasta 600 cc. Se adiciona alcohol metílico hasta que se completa la precipitación. Después de la filtración y secado se obtiene el tri-p-toluensulfonato de SAM, que tiene las mismas características que el obtenido en el ejemplo 1.
- 25.

EJEMPLO 3.

- Se absorben en 1 litro de resina Amberlite IRC 50, forma  $H^+$ , 13,8 litros de solución de SAM obtenida después de la lisis de las células de levadura tal como se ha descrito en el ejemplo 2 (3,60 g/l de SAM), y se eluye a continuación con agua ácido acético 0,025 M y por último con ácido
- 30.



sulfúrico 1 N.

Se tratan las fracciones enriquecidas con SAM (1,8 litros, 86% del producto alimentado en la columna) con una suspensión de  $Ba(OH)_2$  a 0°C hasta que se eliminan por completo los sulfatos.

5.

Después de filtrar y lavar el sulfato de bario, se adicionan 108 g de ácido p-toluensulfónico y se prosigue como en el ejemplo 2, obteniéndose un tri-p-toluensulfonato de SAM con las mismas características que el producto obtenido en el ejemplo 1.

10.

EJEMPLO 4.

Se absorben en una columna de resina 13,8 litros de solución conteniendo 43,3 g de SAM y se eluye como en el ejemplo 2 con HCl acuoso. Se evaporan las fracciones enriquecidas con SAM a 40°C, bajo vacío, hasta sequedad.

15.

Se adiciona agua para obtener una solución de cloruro de SAM al 10% que se precipita por la adición de acetona. La sal así obtenida muestra, con el análisis, las características siguientes:

20.	Cloruros	16,86%
	SAM	78,85%
	H <sub>2</sub> O	4,2%

Se disuelven 10 g de esta sal en 200 cc de agua y se eliminan los cloruros a 0°C con resina Dowex 50, forma OH. Se adicionan a la solución 19,7 g de ácido p-toluensulfónico, se concentra la mezcla a 80 cc bajo vacío a 40°C y se adiciona acetona para precipitar el tri-p-toluensulfonato de SAM que tiene las mismas características que el preparado según el ejemplo 1.

25.

30. EJEMPLO 5.

Se absorben en una columna de resina IRC 50 Amberlite, forma H<sup>+</sup>, 13,8 litros de solución conteniendo 3,60 g/l

417377

= 11 =

30



de SAM obtenido como se describe en el ejemplo 3. Las fracciones ricas en SAM se tratan con  $\text{BaCO}_3$  hasta que la concentración molar de los sulfatos es igual a la de SAM. Se filtra la solución y se concentra el filtrado hasta 500 cc. Con acetona se precipita una sal que tiene, con el análisis, las características siguientes:

Sulfatos	28,2%
SAM	58,9%
$\text{H}_2\text{O}$	5%

10. Se disuelven 10 g de la sal así obtenida en 120 cc de agua y se trata la solución con resina Amberlite IRA 900, forma  $\text{OH}^-$ , hasta que se elimina el ión de sulfato. Después de la filtración de la resina se adicionan 14,7 g de ácido p-toluensulfónico, se concentra la mezcla hasta 60 cc y se utiliza acetona para precipitar un p-toluensulfonato de SAM que tiene las mismas características que las obtenidas en el ejemplo 1.

EJEMPLO 6.

20. Se disuelve 1 g de yoduro de SAM (600 mg de SAM) en 10 cc de agua y se trata con resina Dowex 50, forma  $\text{OH}^-$ , a  $\text{O}^2$ , hasta que se elimina el ión de yoduro. Después de la filtración de la resina, se adicionan 1,5 g de ácido p-toluensulfónico, se concentra la mezcla hasta 6 cc y se utiliza acetona para que precipite el tri-p-toluensulfonato de SAM, que tiene características analíticas iguales a las obtenidas en el ejemplo 1.

30. Por la investigación bioquímica se sabe, desde hace años, que el SAM es el único donador específico de metilos en los organismos vivos para las reacciones bioquímicas de transferencia del grupo  $\text{CH}_3$ , que son reacciones fundamentales en el metabolismo lipídico, protídico y glucídico.

417377

30 JUN 1964



A continuación se exponen, a título de ejemplo, algunas de las reacciones más importantes de transmetilación dependientes de SAM.

5. a) N-transmitilación: adenina, carnitina, carnosina, creatina, 2,6-diamonopurina, adrenalina, guanina, hordenina, N'-nicotinamida, nicotina, fosfatidilcolina, ricinina;
- b) O-transmetilación: N-acetilserotonina, dopamina, epinina, d-adrenalina, l-adrenalina, colesterol, ergosterol, l-noradrenalina, pectina, ubiquinona;
10. c) S-transmitilación: 2,3-dimercaptopropanol, H<sub>2</sub>S, metionina, metilmercaptan, ácido S-mercaptopropiónico, S-mercaptoetanol, tiopirimidina, tiouracilo;
- d) C-transmitilación: citosina, timina.

15. Esto significa, con referencia particular al organismo humano, que el SAM actúa en los procesos metabólicos siguientes:

- biosíntesis de colina; biosíntesis de fosfatidilcolina; actividad de enzimas que requieren grupos SH, metabolismo de catecolaminas; metabolismo de aminas centroencefálicas de biógeno; metabolismo de serotonina, metabolismo de histamina, metabolismo de vitamina B12 y de ácido fólico; metabolismo de creatina; metabolismo de miosina; metabolismo de histonas; metabolismo de RNA; metabolismo de DNA; metabolismo de sustancias
20. protéicas; metabolismo de ciertas hormonas de núcleo perhidrofenantrénico de ciclopentano, siendo las principales los estrógenos; metabolismo de los triglicéridos.
- 25.

Asimismo se sabe, desde hace algún tiempo, que el SAM, una vez desmetilado por las enzimas metiltransferásicas, se transforma en la S-adenosilhomocisteína (SAO) que es un donador indirecto de grupos hidrosulfídicos y, por tanto, tiene una importancia determinante en el metabolismo de los com-

30.

417377

= 13 =

30 JUL.



puestos que requieran grupos SH para llevar a cabo su actividad biológica. Entre éstos revisten particularmente importancia ciertas bioenzimas y los ácidos amino sulfurados.

5. A su vez, la SAO se descarboxila en el organismo y el producto descarboxilado constituye el principal donador del grupo aminopropílico, indispensable (según los más recientes conocimientos bioquímicos) para la biosíntesis de la poliamina.

10. El procedimiento se cataliza por medio de diversas enzimas entre las que una específica es la aminopropil-transferasis.

En resumen puede decirse que se sabe que el SAM en el organismo humano está estrechamente relacionado con todas las reacciones bioquímicas de:

15. A - transmetilación (rendimiento específico del grupo  $\text{CH}_3$ )  
B - transsulfuración (rendimiento específico del grupo SH)  
C - transaminopropilación (rendimiento específico del grupo aminopropílico)

20. La recopilación de estos conocimientos puede conducir a suponer que el SAM posee cierta acción terapéutica en el tratamiento de los datos patológicos vinculados con la carencia o, dicho de otro modo condiciones de deficiencia, en el organismo de algunos de los muchos productos antes citados.

25. Sin embargo, la extrema inestabilidad del SAM y el no poder disponer, hasta el presente, de algún método para hacerlo estable durante un tiempo suficiente bajo condiciones de ambiente normal ha impedido que se sometiera este producto a pruebas farmacológicas o clínicas y, por tanto, se ha imposibilitado el encontrarle algún uso práctico en el campo de
30. la terapéutica humana.

417377

= 14 =



- Solo después de la preparación de la nueva sal de SAM, según el presente invento, (SAM-tri-p-toluensulfonato), sal ésta que en la práctica resulta estable por tiempo indefinido a la temperatura ambiente, ha sido posible llevar a cabo
5. un estudio sistemático farmacológico y clínico, que ha conducido al descubrimiento de la nueva sal de propiedades terapéuticas completamente sorprendentes por su calidad e intensidad.

- De la enorme cantidad de datos farmacológicos y clínicos recogidos para este nuevo producto se dan a continuación
10. solo algunos elementos suficientes para indicar claramente a los expertos en el arte las características esenciales del nuevo producto y sus empleos principales en la terapéutica humana.

- TOXICIDAD -- el tri-p-toluensulfonato de SAM, según el invento, ha probado no producir, en absoluto, toxicidad aguda, toxicidad crónica, intolerancia local o efectos secundarios.
- 15.

En particular, la  $DL_{50}$  en la rata y el ratón es superior a 5 g/kg.

- Las pruebas de tolerancia y toxicidad crónica se efectuaron con ratas de la raza Wister y Sprague-Dowley administrándoles, durante 12 meses, 2-10 mg/kg y día de producto: al cabo del tratamiento los diversos órganos y aparatos no presentaron alteración patológica.
- 20.

- Los ensayos de teratogénesis se llevaron a cabo con conejos y ratas: aún con la administración de dosis masivas de SAM-tri-p-toluensulfonato, 10 veces, aproximadamente, la dosis terapéutica máxima, no se hallaron acciones teratogénicas o deformación alguna en los embriones o el feto final.
- 25.

- La adición de dosis de hasta 0,1-0,2 mg/cc de producto a cultivos sobrevivientes de limfocitos humanos o células hepáticas de ratón no produce alteración alguna del índice de deformación de los elementos celulares.
- 30.

417377

= 15 =



La administración intravenosa con dosis de hasta 20 mg/kg no produce en el conejo ninguna manifestación pirogénica.

5. La administración venosa en el conejo y el gato de 40 mg/kg no causa ninguna alteración de la presión carótida, la frecuencia cardíaca y respiratoria o la traza electrocardíaca.

10. La tolerancia local de la inyección intramuscular, aún después de administraciones repetidas durante 15-20 días, y de la inyección intravenosa en la vena marginal del pabellon auricular, es excelente.

15. En el hombre, en sujetos jóvenes, saludables y voluntarios de ambos sexos sometidos a administración por el método intravenoso rápido o por plebocclisis de dosis de SAM-tri-p-toluensulfonato iguales a 10-500 mg/ (peso promedio 70 kg), el examen simultáneo de la presión mínima y máxima, del pulso y de la frecuencia respiratoria en 1,5,15,20,30,60 minutos y en 2,3,6,8,10,12,24 horas después del término de la administración no muestra ninguna variación de los valores normales.

20.

La traza electrocardiográfica no muestra ninguna variación en el intervalo PQ, en la sección ST, ni aparición alguna de extrasístole u otras alteraciones a los 30", 1', 2', 3', 5', 10' y 20' después de la administración.

25. En el aparato hemopoiético y en la operación hepática y renal no se produjeron variaciones que fueran estadísticamente destacables de lo normal.

30. FARMACOLOGIA - Con el fin de determinar, de forma indicativa y orientativa, como se distribuye el SAM-tri-p-toluensulfonato en los tejidos se preparó cierto producto marcado con  $^{14}\text{C}$  (45 uC/milimol) en el metilo y se administró a cobayos, con dosis de 1uC/g a cobayos de 200 g.

417377

= 16 =

30 JUN 1966



5. Al cabo de 15' de la administración se observó una marcada radioactividad, definible con exactitud mediante técnicas histautorradiográficas, en el cerebro, en la médula espinal, en el hígado, en el pulmón, en los riñones, en las suprarrenales, en la tiroides y en el tracto gastroenterítico.

10. Como consecuencia se dedujo que la nueva sal cruza fácilmente la barrera hematoencefálica y dona el grupo  $\text{CH}_3$  a los tejidos provistos con actividad transferásica de metilo. Dicho de otro modo, se dedujo la capacidad del nuevo producto, según el invento, para localizarlo electivamente en todos los órganos provistos con sistemas metiltransferásicos.

Esto se confirmó con sucesivas pruebas farmacológicas.

15. Una serie completa de pruebas llevadas a cabo con ratas han demostrado que los nuevos compuestos ejercen una notable acción protectora y resolutive de la esteatosis hepática por dieta hiperlipídica-hiperprotéica según Handler, en esteatosis por intoxicación alcohólica aguda y por otros agentes tóxicos con la administración de sólo 10 mg/kg; desde el punto de vista tanto morfohistoquímico como analítico, la S-adenosilmetionina inhibe la acumulación de los lípidos al nivel hepatocitario.

25. En la hiperlipemia experimental en la rata, por ejemplo con Triton S, el tri-p-toluensulfonato de SAM ha mostrado una actividad hipolipemizante que es muy notable y, en relación con la dosis utilizada, que fue de 10 mg/kg, considerablemente mas intensa que otras sustancias de actividad hipolipemizante.

30. En polluelos que se hicieron heteroescleróticos con dietas ricas en colesterol y fructosa, la administración parenteral del nuevo producto con dosis de 10 mg/kg redujo la colecterolemia y modificó favorablemente las lesiones halla-

417377

= 17 =

30



das en las comprobaciones de la oarta abdominal y torácica de los pequeños vasos de la base encefálica.

- Con respecto al metabolismo de los fosfolípidos se halló, experimentalmente, un aumento en la cantidad de fosfatidilcolina en el tejido hepático de ratas con esterosis descompensada. Se halló, asimismo, un aumento distintivo de fosfatidilcolina en las hemáticas de alfa-lipoproteína en las alteraciones experimentales provocadas por las relaciones beta/alfa lipoprotéicas.
- 5.
10. Todas estas pruebas han mostrado claramente un efecto curativo del SAM-tri-p-toluensulfonato en las alteraciones del metabolismo lipídico.
- Otra serie de pruebas llevadas a cabo en la rata han demostrado que la administración de SAM-tri-p-toluensulfonato con dosis de 2 mg/kg induce a una acumulación de las reservas glicogénicas a nivel hepático y muscular, distinguibles mediante técnicas histoquímicas y determinaciones cuantitativas. En la diabetes experimental por aloxano se redujo considerablemente la cantidad de insulina necesaria para volver a los valores glicémicos normales mediante la administración de SAM-tri-p-toluensulfonato en cantidades de 5 mg/kg.
- 15.
- 20.
- Esta serie de pruebas ha demostrado una notable acción positiva del nuevo compuesto, según el invento, sobre el metabolismo glucídico.
- 25.
- Por último, se trataron ratas afectadas de hipodisproteinemia, provocada experimentalmente, con cantidades de 10 mg/kg de SAM-tri-p-toluensulfonato. Se encontró que dicho producto devuelve la normalidad a los valores de proteinemia total, aumentando considerablemente la cota de albúmina y demostrando, por consiguiente, una elevada actividad proteica anabolizante.
- 30.

417377



Estos y otras pruebas similares han demostrado el poder curativo del nuevo producto en los desordenes del metabolismo prótico.

PRUEBAS CLINICAS

5. Siguiendo las indicaciones obtenidas de las pruebas farmacológicas, las pruebas clínicas se orientaron sobre las afecciones patológicas en donde aparece lo que sigue, primitivamente o secundariamente alterado;
- 1 - el metabolismo de los lípidos
  - 2 - el metabolismo de los glúcidos
  - 3 - el metabolismo de los próticos
  - 4 - el metabolismo de las catecolaminas y las aminas biogénicas.
10. 1 - A partir de pruebas llevadas a cabo clínicamente sobre cientos de sujetos utilizando dosis de SAM-tri-p-toluensulfonato variables sobre un intervalo muy amplio, se encontró que el nuevo compuesto induce una rápida caída de los lípidos hepáticos en la hepatosteatosi de la mas variada patogénesis, identificable mediante un exámen bióptico repetido después de terminar el ciclo de tratamiento y aún después de 60 días después de terminado el tratamiento.
15. La administración del producto induce, asimismo, a una notable caída en los valores elevados de colesterolamia total, de hipertrigliceridemia y normaliza las relaciones lipoprotéicas alteradas de beta/alfa y las relaciones pre-beta/beta en los sujetos con hiperdislipidemia en la fase descompensada.
20. Esta actividad hipocolesterolemizante e hipolipemizante se verifica aún con dosis de unos 5 a 10 mg y es proporcional a la dosis.
25. Observaciones paralelas han mostrado, claramente, que la actividad hipocolesterolemizante e hipolipemizante del
- 30.

417377

= 19 =

30 JU



nuevo producto se manifiesta también en sujetos que no responden al tratamiento con los fármacos utilizados habitualmente o a las restricciones diatésicas.

5. En la arterioesclerosis clara con manifestaciones clínicas de la esfera psicoafectiva, con turbomnésicos y centroencefálicos secundarios (deterioración por encefalopatía arterioesclerótica) y fenómenos de hipoxia cerebral, la administración de tri-p-toluensulfonato de SAM por vía intramuscular o, en casos graves, por inyección intravenosa o mediante fleboclisis lenta, con dosis comprendidas entre 20 y 40 mg, ha mostrado una modificación muy favorable de la sintomatología. En particular, en estados hipoxidóticos claros fue muy rápida y estadísticamente importante la recuperación de las funciones relacionadas con la vida de relaciones.
- 10.
15. En los síndromes post-apoplécticos se encontró una mayor celeridad en la resolución del cuadro clínico, probablemente vinculada a la actividad antitrombótica desarrollada por el SAM-tri-p-toluensulfonato tanto en las condiciones de laboratorio como de vida.
20. Con respecto a la actividad antitrombótica, la investigación llevada a cabo bajo condiciones de laboratorio y de vida sobre una gran cantidad de material clínico (plasma rico en plaquetas) ha mostrado claramente la actividad de agregación de antiplaquetas desarrollada con dosis variables del producto. Así pues, por ejemplo, 0,8 mg del compuesto son suficientes para inhibir de forma significativa, la agregación de plaquetas inducida por 40 micromoles de ADP. La curva de agregación de plaquetas para 4 micromoles de ADP se modifica considerablemente en el sentido de antiagregación introduciendo por fleboclisis 2 mg/kg.
- 25.
- 30.

En la práctica el SAM-tri-p-toluensulfonato ha mostrado una potente actividad terapéutica en:

417377

= 20 =

30 JUL



- a) la prevención y tratamiento de trombosis vascular (coronaria o cerebral);
- b) la profilaxis de trombosis, especialmente en ciertos tipos de operaciones quirúrgicas (especialmente ginecológicas y obstétricas).
- 5.
- 2 - La administración clínica a numerosos sujetos afectados de diabetes del SAM-tri-p-toluensulfonato asociado con pequeñas dosis de insulina, en dosis de 5-10 mg por día, mediante inyección intramuscular o intravenosa, ha inducido un marcado aumento en la actividad de la insulina y, por tanto, una reducción en los valores hiperglicémicos y, especialmente, un notable ahorro en las dosis de insulina.
- 10.
- 3 - Se han tratado clínicamente cientos de sujetos afectados de: hipoprotidemias y disprotidemias secundarias; hepatopatías persistentes o agresivas; estados precirróticos o cirróticos; síndromes de malabsorción, síndromes de dispersión protídica. La administración de dosis variables comprendidas entre 50 y 200 mg de SAM-tri-p-toluensulfonato por día y mediante inyección intramuscular o intravenosa (según la gravedad del caso) produjo un aumento estadísticamente significativo en la protidemia total, un aumento en la cota de albúmina y una tendencia a normalizar las relaciones porcentuales alteradas de las fracciones electroforéticas del suero. Esta actividad protéica anabolizante ha sido seguida de una mejora, con frecuencia muy importante, de la sintomatología subjetiva y de las condiciones objetivas generales.
- 15.
- 20.
- 25.
- 4 - Se han obtenido resultados particularmente sorprendentes en aplicaciones clínicas de la nueva sal enzimática según el invento en donde existen cuadros patológicos claramente relacionados con modificaciones en el intercambio de aminos biogénicas, por ejemplo:
- 30.
- a) cuadros patológicos de índole neuropsiquiátrica;

417377

= 21 =

30 JUL



- b) enfermedad de Parkinson y parkinsonismo de diversas etiopatogénesis;
- c) Transtornos del ritmo sueño-insomnio.

5. Con respecto al punto a), una vasta causística clínica llevada a cabo examinando el comportamiento clínico y las pruebas de Hamilton y Wittenberg, ha demostrado claramente que la administración de dosis variables comprendidas entre 20 y 50 mg de SAM por día, durante un período de 20-40 días, induce, excluyendo cualquier otra forma de terapia, una remisión significativa de los parámetros principales, considerados patognómicos para la diagnóstico de las formas depresivas.

15. Con respecto al punto b), relativo al tratamiento de la enfermedad de Parkinson y al parkinsonismo, se ha encontrado que:

20. 1) La administración de SAM en 10-40 mg por día, mediante inyección por vía intramuscular o intravenosa (según la gravedad del caso) en asociación con la terapéutica habitual con Levodopa, produce una mejora estadísticamente más significativa en la acinesia y rigidez con respecto a la que tiene lugar en pacientes tratados únicamente con Levodopa. Se encuentran, asimismo, favorables modificaciones en la extensión del temblor de Parkinson, que no puede modificarse con la Levopoda sola.

25. 2) La administración de SAM-tri-p-toluensulfonato mejora ostensiblemente los transtornos psíquicos asociados con la Levodopa, con relación particular a los estados depresivos y manifestaciones psíquicas de tipo irritativo.

30. 3) La administración de SAM-tri-p-toluensulfonato con las dosis antes indicadas, bloquea la sucesión de efectos secundarios de la Levodopa de los diversos órganos y aparatos, con particular referencia a la náusea, el vómito, la inapetencia,

417377

30



la hipotensión, la estemía, la cefalea, la hipersudoración y el insomnio.

Con respecto al punto c), o sea los transtornos del ritmo del sueño-insomnio, con relación particular al insomnio, el nuevo producto según el invento es apto con una dosis de 5-10 mg para mejorar considerablemente las relaciones alteradas de sueño-insomnio induciendo un sueño fisiológico sin recurrir al uso de barbituratos u otras sustancias de acción depresiva cortical y centroencefálica.

5.

10.

15.

De cuando se ha resumido resultan evidentes las numerosas perspectivas inesperadas que descubre el nuevo fármaco en el campo de la terapéutica humana. Resumiendo puede decirse que los campos de empleo ya investigados son: tratamiento de hepatopias, hiperdislipidemias, arterioesclerosis generalizada o local, manifestaciones psiquiátricas de tipo depresivo y de tipo neurológico, mientras que quedan todavía muchos otros campos de aplicación que se han de examinar e investigar.

20.

El SAM-tri-p-toluensulfonato se administra, de preferencia, por inyección intramuscular o intravenosa.

A continuación se ofrecen algunas composiciones farmacéuticas que se han experimentado ampliamente.

Viales liofilizados

	SAM-tri-p-toluensulfonato	5 mg
25.	" " " "	10 "
	" " "	20 "
	" " "	30 "

Viales de disolvente intramuscular

	Para SAM-tri-p-toluensulfonato	mg	5	10	20	30
30.	Fosfato bisódico anhidro	8	16	32	48	
	Fosfato monosódico anhidro	-	-	0,7	1,3	
	HCl de lidocaina	10	10	20	20	

417377

= 23 =

30 JUL



	Agua apirógena bidestilada c.n.	cc	2	2	3	3
	<u>Viales de disolvente venoso</u>					
	Para SAM-tri-p-toluensulfonato	mg	5	10	20	30
	Fosfato bisódico anhidro		8	16	32	48
5.	Fosfato monosódico anhidro		0,13	0,25	0,9	1,3
	Agua bidestilada apirógena c.n.	cc	2	2	3	3

Otras formas de administración pueden ser:

- a) Supositorios
- b) Líquidos para instilación intranasal, ocular
10. c) Líquidos para aplicación de aerosol
- d) Líquidos para uso tópico.

en las que el principio activo se diluye en los vehículos normales aceptables en farmacia (véase: Silvano Casadio "Tecnología Farmaceutica" - Ed. It. Ed. Cisalpino - Milan - 1960).

15. Concluyendo puede decirse que las dosis terapéuticas de SAM-tri-p-toluensulfonato están comprendidas entre 5 y 200 mg por día, según sea el tipo particular y la gravedad de la afección tratada.

= . =

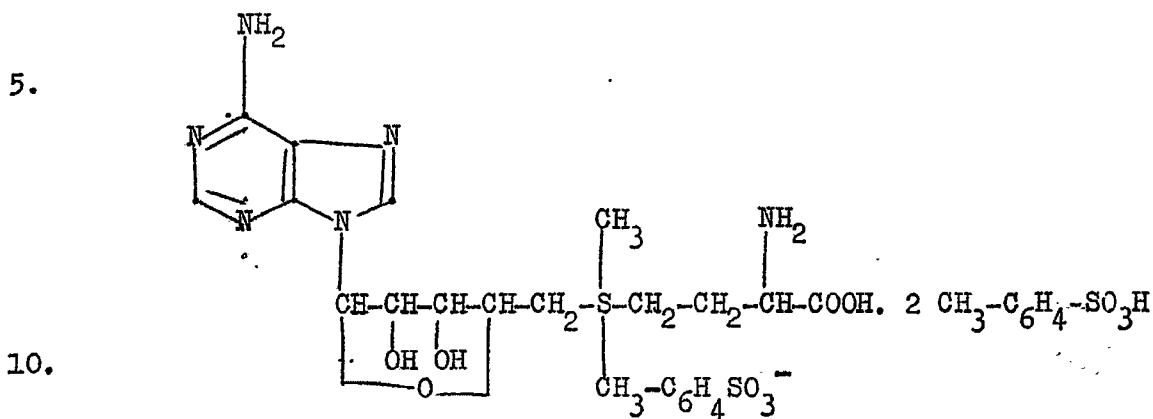
#### N O T A

20. Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente italiana nº 27793-A/72 del 2 de Agosto de 1972.



REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para preparar tri-p-toluensulfonato de S-adenosil-L-metionina de la fórmula,



15.

20.

constituyente del principio activo en composiciones terapéuticas aptas para el tratamiento de afecciones mórbidas en que se altera el metabolismo, caracterizado porque se hace reaccionar ácido p-toluensulfónico con SAM contenido en una solución acuosa, en una relación molar de ácido p-toluensulfónico con respecto al SAM de 3 a 10, de preferencia 6; porque se concentra la solución acuosa hasta un volumen reducido y porque se precipita la sal mediante la adición de un disolvente orgánico soluble en agua.

25.

2.-Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la solución acuosa se concentra a la temperatura ambiente bajo vacío, o se liofiliza hasta que alcanza un volumen de 2/20 a 4/20; de preferencia 3/20, del volumen inicial.

3.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el disolvente orgánico so-

417377



luble en agua precipitante del producto de reacción se elige del grupo constituido por alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol propílico, alcohol isopropílico, acetona y metiletilcetona.

5. 4.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la solución acuosa que contiene SAM se origina en una primera fase de la lisis de células de levadura enriquecida con SAM, con acetato etílico o metílico a la temperatura ambiente.
10. 5.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque la solución acuosa que contiene SAM antes de su reacción se hace absorber en una columna que contiene una resina catiónica débil de forma ácida.
15. 6.- Un procedimiento, de conformidad con las reivindicaciones 4 y 5, caracterizado porque el SAM se eluye selectivamente de la columna intercambiadora con una solución acuosa de ácido p-toluensulfónico.
20. 7.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque se efectúa un lavado previo en una columna con agua y luego con ácido acético 0,025 N.
25. 8.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque el exceso de ácido p-toluensulfónico contenido en la solución resultante se neutraliza con una resina aniónica fuerte o débil hasta que se obtiene una relación molar de ácido/SAM de 3 a 10, de preferencia 6.

*kg*

417377



5. 9.- Un procedimiento, de conformidad con las reivindicaciones 4 y 5, caracterizado porque en una variante del mismo el SAM se eluye selectivamente de la columna intercambiadora mediante una solución acuosa de ácido fuerte de preferencia ácido clorhídrico o sulfúrico.

10. 10.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el eluato obtenido con ácido clorhídrico o sulfúrico se neutraliza con una resina aniónica de forma hidróxido y con una base apropiada, se filtra y luego se trata con ácido p-toluensulfónico en una cantidad tal que proporcione una relación molar de ácido a SAM de 3 a 10, de preferencia 6.

15. 11.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque opcionalmente el cloruro o sulfato de SAM se precipita del eluato, se disuelve esta sal en agua y se trata la solución <sup>acuosa</sup> con ácido p-toluensulfónico en una cantidad tal que proporcione una relación molar de ácido a SAM de 3 a 10 de preferencia 6.

20. 12.- Un procedimiento para preparar tri-p-toluen-sulfonato de S-adenosil-L-metionina.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 26 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 30 JUL. 1973

25.

p.a. p.p. JAIME ISERN

Firmado: JOSE F. NIETO